Paris

FACULTE DE MEDECINE BICHAT BEAUJON

Année 1971 N° 8

THESE

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'état)

Par

Madame GARON Dominique , Claudette née TROUILLOUX
le 5 juillet 1943 à Ligny-le-châtel Yonne

Présentée et soutenue publiquement le 1971

LES ENZYMES PROTEOLYTIQUES DANS L'INDUSTRIE : LEUR UTILISATION , LEUR DANGER .

Président :Monsieur le professeur H. DESOILLE

FACULTE DE MEDECINE BICHAT BEAUJON

Année 1971 N°

T H E S E

pour le

D O C T O R A T E N M E D E C I N E

(Diplôme d'état)

Par

Madame GARON Dominique , Claudette née TROUILLOUX
le 5 juillet 1943 à Ligny-le-châtel Yonne

Présentée et soutenue publiquement le 19

LES ENZYMES PROTEOLYTIQUES DANS L'INDUSTRIE : LEUR UTILISATION , LEUR DANGER .

Président :Monsieur le professeur H. DESOILLE

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A ma mère

A mon père

A mon mari

A mes beaux parents .

A Monsieur le Professeur Desoille

qui m'a fait l'honneur de bien vouloir accepter la présidence de cette thèse . Qu'il trouve ici le témoignage de ma respectueuse gratitude .

A Monsieur le Docteur Cavigneaux

qui m'a guidée dans ce travail par son expérience et ses conseils éclairés , qui a mis à ma disposition de nouvelles observations . Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse reconnaissance .

PLAN

- INTRODUCTION 1

- RAPPEL HISTORIQUE 2

- CHAPITRE I : Etude biochimique de la constitution et du mécanisme d'action d'un enzyme 3
  I - Structure des enzymes 4
  II - Mode d'action des enzymes 5
  III - Méthodes de dosage des enzymes 10
  a - les différentes méthodes
  b - leur utilisation
  IV - Intérêt de la connaissance de la réaction enzymatique dans l'industrie 14

- CHAPITRE II : Utilisation des enzymes protéolytiques en thérapeutique et dans l'attendrissage des viandes 15

- CHAPITRE III : Les enzymes protéolytiques dans l'industrie . 19
  I - Les principaux enzymes utilisés, leur origine 20
  II - Les manifestations pathologiques provoquées par les enzymes protéolytiques 21
  1) Les accidents cutanés 22
  2) Les accidents respiratoires 29
  A - expérimentations chez l'animal
  B - constatations chez l'homme
  3) Traitement de ces divers accidents 37
  III - Utilisation industrielle des enzymes protéolytiques. 38
  1) Fabrication industrielle 38
  2) Les industries employant des enzymes protéolytiques 40
  IV - Les moyens de protection 46
  1) Utilisation d'enzymes en phase liquide 47
  - protection collective
  - protection individuelle

2) Utilisation d'enzymes en phase sèche 47
- protection collective
- protection individuelle

- CHAPITRE IV : LA LEGISLATION 51
I - Normes industrielles 52
- étiquetage
- conditionnement
II - Réparation des maladies professionnelles causées par les enzymes protéolytiques 53

- CONCLUSION 55

- BIBLIOGRAPHIE 58

INTRODUCTION

C'est après avoir eu connaissance de quelques cas de maladies professionnelles provoquées par des enzymes protéolytiques , qu'il nous a paru intéressant d'étudier les connaissances actuelles sur ce sujet .

Il s'agit en effet d'une pathologie nouvelle apparue avec les progrès incessants de l'industrie moderne .

Vers les années 1950 on avait individualisé une dermatose provoquée par la manipulation d'enzymes protéolytiques , mais elle restait une maladie rare , ne se rencontrant guère que dans les industries manipulant des ananas frais ou des pancréas d'animaux .

L'apparition d'enzymes protéolytiques d'origine fongique d'obtention facile , la maîtrise de la réaction enzymatique , ont généralisé leur utilisation dans l'industrie .

C'est à la suite de leur introduction dans les détergents que leur emploi s'est multiplié .

De nombreuses industries emploient actuellement des enzymes protéolytiques : ce sont les industries textiles , alimentaires , des cuirs , des cosmétiques , mais surtout les industries pharmaceutiques et les industries des détergents .

C'est dans ces deux industries que l'on a rencontré des cas de maladies professionnelles .

L'emploi d'enzymes protéolytiques a présenté de gros avantages en permettant la fabrication de produits de meilleure qualité : et plus particulièrement les lessives fort appréciées des ménagères .

Depuis 4 à 5 ans date de leur introduction dans les détergents , est apparue une pathologie professionnelle respiratoire qui leur est propre . Les manifestations respiratoires engendrées sont d'origine allergique , elles peuvent être graves , et présenter de sérieux inconvénients pour le travailleur .

RAPPEL HISTORIQUE

L'action des enzymes est connue depuis de nombreux siècles et a été exploitée d'abord par les populations primitives , puis progressivement s'est introduite dans l'industrie .

Utilisation par les peuplades primitives :

Les indigènes de Malaisie connaissaient les propriétés du jus de papayer , et en particulier son pouvoir de ramollir les viandes dures : les chasseurs suspendaient leur gibier aux branches de papayer ou le faisaient cuire avec des morceaux de papayer pour l'attendrir .
Dès 1789 Hugues écrivait dans l'histoire de la Barbade : " le suc de papayer contient une matière telle que si l'on fait bouillir le fruit vert avec de la viande dure elle devient tendre en quelques minutes".
Cortez lui aussi fut frappé à son arrivée au Mexique par le fait que les indigènes enveloppaient leur viande dans des feuilles de papayer pour l'attendrir .

Utilisatiom dans l'industrie :

L'emploi des enzymes dans l'industrie est aussi fort ancien : c'est ainsi que dans l'industrie des cuirs l'opération de confitage faite à l'aide de confits naturels était efficace par les enzymes contenus et sécrétés par les bactéries présentes dans ces confits .
Beaucoup plus récemment l'ère Pastorienne a étudié de façon plus scientifique ces mystérieuses levures .
De nombreuses applications industrielles ont fait suite à ces études

Actuellement les enzymes et en particulier les enzymes protéolytiques sont employés chaque jour dans de nombreuses industries .

CHAPITRE I

ETUDE BIOCHIMIQUE DE LA CONSTITUTION ET DU MECANISME D" ACTION D' UN ENZYME

L'origine du mot enzyme viendrait du grec zeo qui veut dire bouillir la levure étant pour les Grecs le facteur de la mystérieuse ébullition interne propre à la panification et à diverses fermentations .

L'étude des enzymes n'est devenue scientifique qu'à partir de 1833 avec Payen et Perzoz qui isolèrent pour la première fois un enzyme .

Actuellement on peut définir un enzyme comme étant un catalyseur organique produit par des cellules vivantes .

I - LA STRUCTURE DES ENZYMES

On s'est aperçu que la dialyse faisait perdre à de nombreux enzymes leur activité , celle ci étant restaurée lorsque l'on rajoutait le dialysat .
On en a déduit que les enzymes étaient constitués de deux parties :

- une partie dialysable : le coenzyme
- une partie non dialysable : l'apoenzyme .

Le coenzyme :

Il est de nature très variée : métaux
dérivés vitaminiques du groupe B
dérivés tétrapyrroliques

Il est responsable de la spécificité du type de réaction chimique .

L'apoenzyme :

Il est de nature protéique , formé de chaînes polypeptidiques de structure plus ou moins complexe .
Il est responsable de la spécificité du substrat dans la réaction .

La liaison apoenzyme-coenzyme :

Cette liaison est plus ou moins forte .
Lorsqu'elle est faible dans la majorité des cas une simple dialyse suffit pour la dissocier , dans d'autres cas cette liaison est très forte et on ne peut la rompre sans dénaturer l'enzyme .

La notion de centre actif :

On s'est aperçu que l'on pouvait dans certains cas enlever une partie de la molécule protéique sans modifier l'activité enzymatique . D'où la notion de centre actif ; l'action enzymatique serait localisée dans un petit nombre d'acides aminés formant un centre actif .

L'individualisation de ce centre actif est un point de départ pour l'étude du mode d'action des enzymes .

Les isoenzymes :

Certains enzymes que l'on appelle des isoenzymes sont constitués par des coenzymes similaires et des apoenzymes très voisins , ils possèdent tous la même spécificité enzymatique . Ces isoenzymes contiennent des centres actifs identiques .

Les enzymes dans la cellule :

Les enzymes sont produits par des cellules vivantes .
Ils sont localisés dans la cellule souvent en fonction de leur activité , ils peuvent se situer :

- dans le noyau
- dans la fraction soluble
- dans les mitochondries
- dans les microsomes .

Les enzymes se trouvent fréquemment dans la cellule sous forme inactive : le proenzyme .
C'est ainsi que le trypsinogène est activé en trypsine par l'entérokinase ; et le chymotrypsinogène est activé en chymotrypsine .

II - LE MODE D'ACTION DES ENZYMES

La réaction enzymatique a deux caractères fondamentaux :

- c'est une réaction réversible
- c'est une réaction spécifique

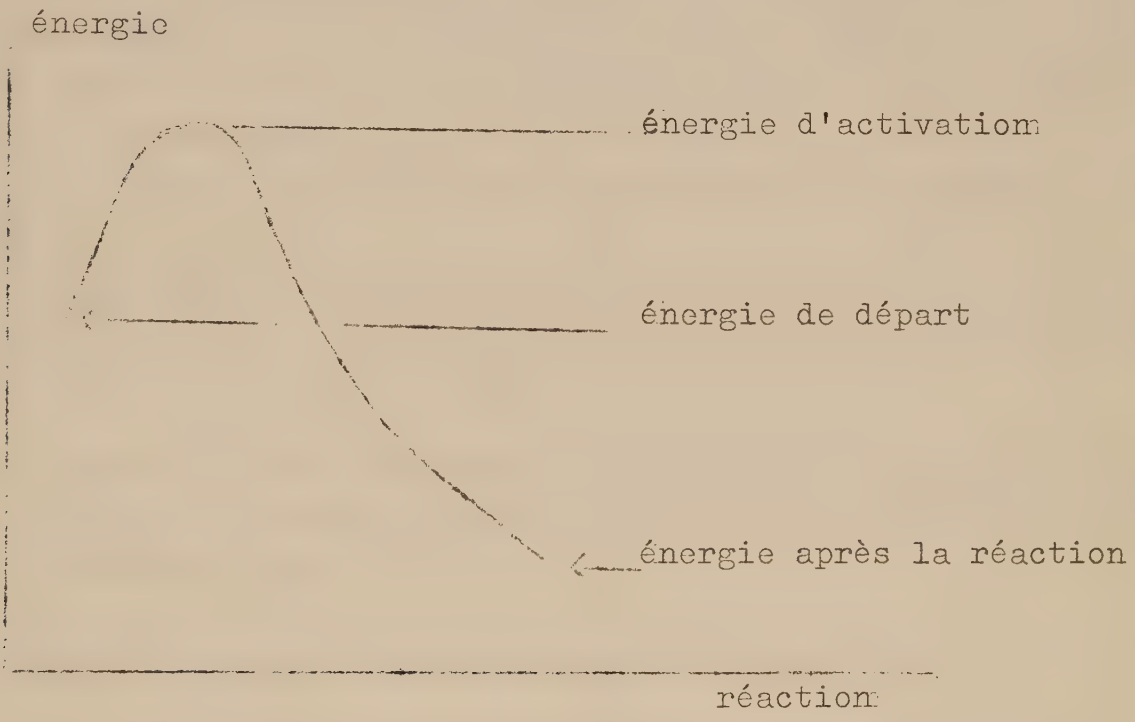
Cette spécificité est due à la structure moléculaire de l'enzyme .

La propriété essentielle de l'enzyme est la transformation catalytique d'une substance dite substrat .
Cette transformation du substrat nécessite souvent l'existence d'autres molécules dans le milieu réactionnel ce sont des activateurs .

L'enzyme agit comme un catalyseur qui permet à une réaction lente de se produire rapidement .

1) La réaction enzymatique

Dans une réaction chimique le système passe d'un niveau énergétique élevé à un niveau énergétique plus bas . Mais il faut en général , que le système atteigne tout d'abord un niveau énergétique supérieur au niveau initial .
Ce que l'on peut schématiser ainsi :



Pour amorcer la réaction il faut donc atteindre ce niveau d'énergie supérieur à l'énergie de départ ; on l'obtient par l'apport d'une énergie d'activation .
Cette énergie étant fournie la réaction se déclenche et restaure l'énergie d'activation en plus de l'énergie libérée par la réaction .
Spontanément très peu de molécules atteignent le niveau d'énergie nécessaire au déclenchement de la réaction . On peut augmenter le nombre de ces molécules par des moyens physiques tels que le chauffage .
Mais c'est ici que survient tout l'intérêt des enzymes :

les enzymes comme tous les catalyseurs ont pour propriété d'abaisser l'énergie d'activation .

L'enzyme abaisse le seuil d'activation d'une manière relativement simple :
lorsque l'énergie d'activation est produite par le chauffage, celui-ci entraine une agitation moléculaire accrue, qui favorise les contacts et les interactions moléculaires, en modifiant les conditions d'attraction et de répulsion des groupes polaires ou des sites au niveau desquels jouent les forces de Van der Waals.
L'enzyme agit en bloquant certains groupes polaires , ou en favorisant une disposition sérique particulière des molécules auxquelles il se fixe .
En fait il agit dans le même sens qu'un apport énergétique cinétique .
Le blocage des groupements polaires par l'enzyme et sa fixation peut être favorisé ou inhibé par la présence d'ions métalliques ou divers groupements chimiques dans le milieu .

Les enzymes qui vont augmenter la vitesse des réactions parfois de façon très importante ne modifient ni la nature des réactions, ni l'équilibre final .

L'enzyme se retrouve intact en fin de réaction .

On peut schématiser de cette façon une réaction enzymatique :

$$E + S \rightleftharpoons E\,S \rightleftharpoons E\,P \rightleftharpoons E + P$$

E = enzyme
S = substrat
P = produit de transformation du substrat

a) <u>envisageons tout d'abord la première phase de la réaction</u>

$$E + S \rightleftharpoons E\,S$$

La fixation de l'enzyme sur le substrat est une réaction équilibrée

soumise à l'action de masse .
Pour une certaine concentration de substrat , la moitié de l'enzyme sera combiné à lui . Cette valeur est la constante de Michaelis qui détermine l'affinité de l'enzyme pour le substrat .
Lorsque la moitié de l'enzyme est combiné au substrat la vitesse de réaction est égale à la moitié de la vitesse maximale .

K = constante de Michaelis

La constante de Michaelis permet de définir l'affinité d'un enzyme pour son substrat .
Plus elle est faible plus l'affinité de l'enzyme est fort donc plus la vitesse de réaction est élevée .

b) <u>dans la seconde phase de la réaction</u>

$$E\,P \rightleftharpoons E + P$$

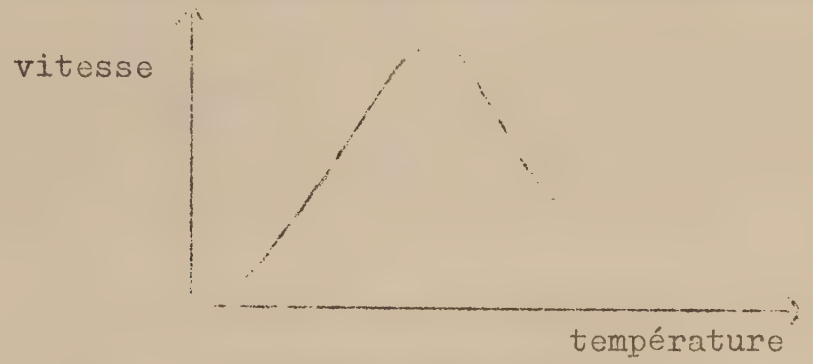
où est restitué l'enzyme et apparaît le produit transformé , la réaction enzymatique s'arrête lorsque l'équilibre EP et E + P est atteint .
On peut accélérer cette phase en soustrayant le produit transformé au milieu réactionnel .

2 - Les agents modificateurs des réactions enzymatiques

Ils sont nombreux .

a) La température :

Lorsque l'on fait varier la température d'une réaction on s'aperçoit qu'il existe une température pour laquelle la vitesse est optimale.

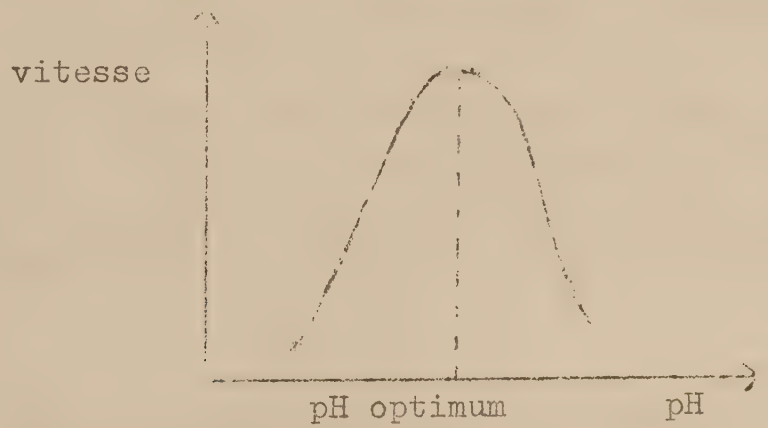


L'augmentation de la température accélère la réaction enzymatique .

Mais l'augmentation de la température dénature les protéines et ce phénomène s'accentue rapidement à partir d'une certaine température, ce qui explique la chute de la courbe .

b) Le pH :

Il existe aussi un pH optimum dans les vitesses de réaction enzymatique ce pH optimum varie d'un enzyme à l'autre mais il est fréquemment compris entre 5 et 8 .



D'autres facteurs peuvent intervenir pour modifier la vitesse de la réaction enzymatique ce sont les activateurs et les inhibiteurs .

c) Les activateurs:

Nous avons déjà vu qu'un certain nombre de substances peuvent augmenter l'activité enzymatique :

ce sont - des ions Zn^{++} , Mg^{++} , Cl^{-}
- des protéines inertes
- des protecteurs de radicaux actifs des enzymes .

d) Les inhibiteurs :

Ils peuvent agir en se combinant à l'enzyme à la place du substrat, ils ont alors une constitution chimique voisine du substrat . Ce sont des inhibiteurs compétitifs .

Les autres inhibiteurs sont plus variés :

- agents dénaturants des protéines
- substances se combinant aux coenzymes
- substances se fixant sur les radicaux actifs de l'apoenzyme.

Nous voyons donc qu'une réaction enzymatique est fort complexe et fait entrer en jeu de nombreux paramètres .

3 - Mécanisme d'action des enzymes protéolytiques .

L'action des enzymes protéolytiques se manifeste de plusieurs façons sur les protéines .

Certains enzymes dégradent les polypeptides en rompant les liaisons en fin de chaîne : ce sont les exopeptidases ; d'autres rompent les liaisons peptidiques non seulement en fin de chaîne mais aussi les liaisons centrales : ce sont les endopeptidases .

III - METHODES DE DOSAGE DES ENZYMES

Les techniques utilisées sont dans l'ensemble assez complexes .

Elles diffèrent selon qu'on se trouve :

- en milieu industriel
- en milieu pharmaceutique
- en milieu médical .

a) Les différentes méthodes :

Deux types de méthodes s'opposent : les méthodes anciennes , et les méthodes modernes .

1 - Les méthodes anciennes:

Elles emploient un substrat naturel .
Ce substrat ne présente pas une spécificité absolue par rapport à un enzyme déterminé , on dose ainsi l'activité enzymatique de l'ensemble des enzymes protéolytiques contenus dans le milieu .
Les différents substrats employés sont les suivants :

- la caséine , qui hydrolysée libère de la thyrosine et du tryptophane
- l'hémaglobine
- la gélatine
- la fibrine
- la sérum albumine .

2 - Les méthodes modernes :

Elles utilisent un substrat synthétique de faible poids moléculaire spécifique de l'enzyme à doser .
Le dosage peut se faire par :

- titrimétrie
- manométrie
- potentiométrie
- spectrophotométrie .

b) Leur utilisation :

1 - En milieu industriel :

Pour le dosage des protéases on emploie les méthodes anciennes.

On fait agir l'enzyme sur un substrat naturel , puis on estime la libération de groupes aminés ou carboxyles de lysine ou arginine .
Les mesures peuvent être effectuées par différentes techniques :

- technique de Van Slyke
- technique de titration des groupes carboxyles dans la potasse alcoolique (Grassmann)
- technique de titration des groupements aminés par l'acide chlorhydrique dans l'acétone (Linderstrom)
- technique colorimétrique à la ninhydrine : c'est la technique la plus couramment employée.

Elle consiste après une hydrolyse de la caséine à doser les acides aminés formés , par la ninhydrine .
On opère de la façon suivante :
la mesure se réalise en deux temps
. un temps d'incubation
pendant lequel on laisse réagir l'enzyme sur la caséine à 40° pendant 7 minutes ½
. un temps d'analyse
pendant lequel l'échantillon incubé est mélangé à la ninhydrine, chauffé à 96° pendant 3 minutes environ , puis refroidi à 40° pour la mesure colorimétrique .
La coloration résultante est proportionnelle à la quantité d'acides aminés formés . On la mesure à l'aide d'un colorimètre .

2 - En milieu pharmaceutique :

On a besoin de connaître avec une grande précision la quantité d'enzyme contenue dans diverses préparations .
On utilise alors les techniques modernes , employant des substrats synthétiques spécifiques de l'enzyme à doser .

Pour la trypsine les principaux substrats employés sont les suivants

- le BAA : n benzoïl arginine amide
  on dose ensuite le NH_3 libéré
- le BAEE : n benzoïl arginine éthyl ester
  on peut ensuite doser l'éthanol
  ou titrer la fonction acide libérée
- le BANA : n benzoïl arginine β naphtylamine
  on peut ensuite faire un dosage colorimétrique ou spectrofluorométrique de la naphtylamine
- le BAPNA : n benzoïl arginine para nitro anilide
- le TAME : p toluène sulfonyl arginine méthyl ester
  on peut ensuite titrer la fonction acide libérée
  ou effectuer une mesure fluorométrique du méthyl alcool formé .

Pour la chymotrypsine :
on utilise l' ATEE : ester éthylique de l'acétyl thyrosine .

Toutes ces méthodes sont assez complexes .

3 - <u>En milieu médical</u> :

On dose la trypsine et la chymotrypsine du suc duodénal prélevé par tubage .

- On peut employer des méthodes anciennes en se servant de gélatine comme substrat ; ou des méthodes modernes en utilisant un substrat synthétique , tel que dans la méthode de Schwert qui consiste à doser à l'aide d'un pHmètre sensible , les ions H^+ libérés lors de l'action de la trypsine sur le BAEE .

- Il existe une autre méthode originale qui n'est pas d'usage courant , qui consiste à faire le dosage au moyen de la gélatine des films photographiques .
Cette méthode a été utilisée par Bernier , Laporte et Trémolière avec des résultats satisfaisants et une précision correcte .

C'est une méthode qui présente en outre l'avantage d'être très simple et peu onéreuse .

Il s'agit d'apprécier la digestion de la gélatine d'un film photographique après ½ heure de contact avec le liquide à examiner . On réalise préalablement une série de dilutions , et on lit le résultat à la dilution la plus grande pour laquelle la gélatine a été complètement digérée .

IV - INTERET DE LA CONNAISSANCE DE LA REACTION ENZYMATIQUE DANS L'INDUSTRIE

Les premiers essais sur l'emploi de préparations enzymatiques ont été décevants . En effet lorsque l'on ne connaissait pas le mécanisme de cette réaction on était incapable de l'arrêter rapidement au moment voulu ; et l'action était ou trop prolongée ou insuffisante , ce qui entrainait soit une perte importante , soit la fabrication de produits de mauvaise qualité .

L'étude de la réaction enzymatique et de tous ses paramètres a permis de la maîtriser facilement . On peut maintenant l'accélérer , la ralentir et surtout l'arrêter au bon moment par de simples variations de température ou de pH . Ceci a permis la fabrication de produits de qualité meilleure et constante .

La réaction enzymatique est maintenant employée chaque jour dans l'industrie .

CHAPITRE II

UTILISATION DES ENZYMES PROTEOLYTIQUES EN THERAPEUTIQUE ET DANS L'ATTENDRISSAGE DES VIANDES.

I - UTILISATION DES ENZYMES PROTEOLYTIQUES EN THERAPEUTIQUE

Certaines actions des enzymes protéolytiques sont utilisées depuis longtemps en thérapeutique .

Les indigènes de Malaisie appliquaient sur les ulcères suppurant de la pulpe de feuille de papayer avec un résultat assez satisfaisant .

A Singapour on traitait il y a quelques années les alvéolites dentaires suppurées en appliquant un coton trempé dans du latex de papayer avec aussi un résultat favorable .

Vers 1940 on traitait localement les brulûres par des solutions d'enzymes protéolytiques .
L'enzyme employé était le papaïne en solution avec des activateurs.
Les résultats étaient assez favorables :

On posait sur l'escharo des compresses imbibées de solution enzymatique et en quelques heures (6h à 36h) les tissus nécrosés étaient digérés ou soulevés permettant une excision facile .
Il n'y avait pas de réaction évidente sur les tissus sains d'alentour avec les solutions employées .
On notait aussi une prévention de l'infection , ce qui peut s'expliquer par l'élimination des tissus nécrosés toujours favorables à un gîte microbien , mais aussi par l'action antibiotique propre de la papaïne .

La papaïne a en effet une action bactériostatique nette pour certains germes , et en particulier le streptocoque et le staphylocoque .
Cette action est renforcée par la présence d'agents réducteurs et inhibée par la présence d'oxydants .

Les progrès de l'industrie pharmaceutique ont permis l'emploi assez

large des enzymes protéolytiques en thérapeutique courante .
Car on est en mesure de présenter des préparations purifiées et dosées de façon assez rigoureuse .
Le dosage peut se faire par le poids de l'enzyme contenu dans la préparation , ou par l'étude de la vitesse de la réaction enzymatique dans des conditions déterminées de température , de pH , et de concentration de substrat .

Les principaux enzymes commercialisés sont :

- la trypsine
- l' α chymotrypsine

- La trypsine:

Elle est employée en chirurgie pour le nettoyage des plaies .

- L' α chymotrypsine:

Elle est employée pour ses actions
- fibrinolytique
- antiinflammatoire
- antioedémateuse

elle a en outre la propriété d'accélérer la cicatrisation .

On a employé l' α chymotrypsine en anesthésiologie et en réanimation dans la prévention et le traitement des complications respiratoires:
Les aérosols d' α chymotrypsine dissolvent les mucosités , et évitent la production d'abondantes sécrétions bronchiques , source de nombreuses complications respiratoires chez des malades qui ne peuvent pas tousser .

Des accidents de nature allergique ont été signalés lors de l'emploi d'enzymes protéolytiques par voie parentérale : ce sont des accidents de choc anaphylactique extrêmement graves .
Leur fréquence semble équivalente à celle des accidents produits par la pénicilline .
Ce sont donc des produits à manier avec une très grande prudence .

II - L'ATTENDRISSAGE DES VIANDES PAR LES ENZYMES PROTEOLYTIQUES

Nous avons déjà vu que les indigènes d'Amérique du sud se servaient de fruit de papayer pour attendrir leur gibier .

Des études récentes ont été faites dans le but d'obtenir une viande de consommation plus tendre à meilleur marché .
Deux techniques ont été expérimentées :

- l'attendrissage ante mortem par injection jugulaire ou intra-péritonéale de papaïne brute ,
- l'attendrissage post mortem par saupoudrage , immersion , ou injection vasculaire , dans ce cas se pose le problème de la pénétration de l'enzyme à l'intérieur du tissu musculaire .

On a noté après l'emploi de tels procédés l'apparition d'accidents allergiques chez les consommateurs de telles viandes .
Ces accidents peuvent être dû à l'emploi de l'enzyme lui même , ou à des substances protéiniques dues à la dégradation partielle des protéines .
L'emploi de ces techniques est délicat : on oscille entre un sous dosage supprimant l'intérêt de l'utilisation de l'enzyme , et un sur dosage donnant une viande trop tendre .
De toute façon en France l'usage industriel de tels procédés est interdit par la loi .
Seul l'usage de préparations enzymatiques par des particuliers est autorisé .

CHAPITRE III

LES ENZYMES PROTEOLYTIQUES DANS L'INDUSTRIE

I - LES PRINCIPAUX ENZYMES UTILISES - LEUR ORIGINE

Les enzymes protéolytiques utilisés dans l'industrie sont nombreux et d'origine diverse .

a) Ils peuvent être d'origine animale :

Ce sont : la trypsine
la chymotrypsine
obtenues à partir de pancréas d'animaux
la sécrétine
obtenue à partir d'estomac d'animaux

b) Ils peuvent être d'origine végétale :

Les principaux sont : la broméline
la papaïne
la ficine

La broméline

Elle provient de l'ananas , on la trouve dans le fruit
la tige
la racine

Dans la production commerciale les tiges sont utilisées comme matière première . Elles sont collectées après la récolte , effeuillées et broyées . Dans le jus ainsi obtenu on extrait la broméline .

La papaïne

Elle provient du papayer . c'est un arbre originaire d'Amérique tropicale de 5 à 10 mètres de haut .
Sa culture se fait du niveau de la mer à 900 mètres d'altitude .
On récolte le latex en entaillant le péricarpe du fruit encore vert à l'aide d'un couteau en bois ou en os , tout instrument en fer noircissant le suc . Il s'écoule un liquide laiteux plus dense que l'eau , coagulant à l'air . La papaïne se trouve dans ce latex .

C'est l'enzyme protéolytique végétal le plus important et l'un des plus utilisés.

La ficine

Elle provient du latex d'un arbre du genre ficus cultivé en Amérique du sud .

c) Les enzymes bactériens et fongiques :

Ils sont aussi très employés .
Les plus courants sont produits par des cultures :

- d'aspergillus orysae
- de bacillus subtilis

A noter le koji qui est obtenu par culture contrôlée d'aspergillus orysae sur graines de céréales , son originalité tient au fait qu'il est connu au Japon depuis au moins 1700 ans .

II - LES MANIFESTATIONS PATHOLOGIQUES PROVOQUEES PAR LES ENZYMES PROTEOLYTIQUES

Les manifestations pathologiques dues à l'emploi et à la manipulation des enzymes protéolytiques sont de deux ordres :

- Les unes connues depuis fort longtemps sont dues aux phénomènes de digestion protidique provoqués par les enzymes .
- Les autres d' apparition plus récente sont des phénomènes allergiques essentiellement pulmonaires .

1) LES ACCIDENTS CUTANES

Ils sont les premiers à avoir reçu une application ;
nous avons déjà vu :

- l'utilisation du papayer par les indigènes de Malaisie pour attendrir leur gibier,
- plus récemment l'utilisation des enzymes protéolytiques en thérapeutique dans le traitement des brûlures ,
- et les études effectuées , pour l'utilisation des enzymes protéolytiques pour l'attendrissage des viandes de consommation .

Les premiers textes relatant les manifestations pathologiques survenues chez les travailleurs manipulant des enzymes datent de 1940 Schwartz décrit à cette époque l'apparition d'érosions unguéales chez les travailleurs extrayant les pancréas des carcasses d'animaux :

les ongles sont érodés et ont l'apparence d'être mangés aux mites .
Ils régénèrent rapidement quand le contact avec le jus de pancréas cesse .

Cette étude a la particularité d'être la seule faisant état de lésions unguéales , et d'autre part elle ne note pas la présence de lésions cutanées .

La première étude importante et complète sur l'action des enzymes protéolytiques sur la peau des travailleurs qui les manipulent est celle de Polunin (1951)
Polunin a étudié cette action chez les travailleurs Malais des conserveries d'ananas .
Il a d'ailleur noté qu'en Hawaï où cette industrie est très mécanisée et la manipulation réduite au minimum , la dermatose due au

jus d'ananas est très rare ; par contre en Malaisie où l'intervention humaine est encore importante la dermatose est fréquente . Ceci est dû au fait que les gants usagés protègent mal et que l'ouvrier mal éduqué néglige le port des gants .

Etude de la dermatose

1 - début :

- elle apparaît très rapidement .
  Quand la pulpe d'ananas entre en contact avec la main , il apparaît en moins de trois minutes une légère sensation de picotement.
- Cette sensation de picotement augmente progressivement et devient pénible au bout de 15 minutes .
- On note à ce moment un érythème irrégulier à la surface des mains .

2 - siège :

Chez les travailleurs des conserveries d'ananas elle survient à la main gauche , main qui sert pour tenir le fruit , alors que la main droite tient le couteau pour le couper .
Elle survient donc sur les zones exposées .
Elle est particulièrement marquée :

- sur les écorchures
- aux zones où la peau est plus fine
- aux endroits où la pression est maximale .

3 - évolution :

- Au bout d'une heure la main exposée est d'un rose brillant .
- Dans les premiers jours d'exposition la peau des mains est sensible , on peut noter :
  . des érosions superficielles douloureuses siégeant à la face palmaire des doigts
  . parfois même de profondes fissures au niveau des plis de flexion , qui peuvent être douloureuses et même saigner .

- Vers le troisième jour d'exposition la main devient blanc opaque, à partir de ce moment la douleur disparaît .
  Cet aspect blanc opaque se développe chaque jour pendant le travail sur les zones de pression et disparaît après le travail lorsque la main est au sec .
  La main prend alors un aspect rose .

- A la longue la peau des mains devient extrêmement lisse , semblant usée .
  Les empreintes digitales disparaissent .
  Les érosions ne suppurent jamais bien qu'elles soient souvent sanguinolentes .

- A l'arrêt du travail il se développe une roseur généralisée de la couche cornée de la face palmaire des mains .
  Les empreintes réapparaissent .

- Après plusieurs semaines la peau est de nouveau normale .

Les principaux caractères de cette dermatose :

- son apparition rapide dès le début du travail
- sa localisation aux zones exposées
- sa guérison rapide à l'arrêt de l'exposition au jus d'ananas ,

suggèrent qu'elle est due à une action directe physique ou chimique d'un agent contenu dans le jus d'ananas , et non au développement d'une sensibilité de la peau à des protéines ou à d'autres constituants du jus d'ananas .

Les principaux constituants du jus d'ananas sont :

- Le sucre
- L'acide lactique
- La broméline .

La broméline :

C'est un enzyme protéolytique qui est détruit par la chaleur : à 60°

pendant 15 minutes .
Dans le processus de mise en conserve , les boîtes sont placées dans de l'eau bouillante pendant 30 minutes ce qui détruit totalement l'enzyme .
Or le jus d'ananas de conserve même au contact des mains ne provoque jamais de dermatose .
Il existe d'autre part des dégustateurs de jus d'ananas :

- lorsqu'ils goûtent de l'ananas en boîte ils ne présentent aucun troubles ,
- par contre s'ils goûtent de l'ananas frais ils peuvent présenter un endolorissement de la bouche qui peut être sévère, souvent associé à un saignement de la langue .

La broméline est donc bien responsable de la dermatose .

L' étude de cette dermatose a montré que le contact de l'enzyme sur la peau est insuffisant pour la créer , il faut en outre :

- une pression
- ou un frottement .

Une dermatose identique peut être créée dans les mêmes conditions par d'autres enzymes protéolytiques : la papaïne en particulier .

L'étude microscopique des lésions :

Elle a pu être faite dans de rares cas .
Elle montre la présence d'hémorragies au niveau des sinuosités capillaires à l'intérieur des papilles dermiques .
Les conduits des glandes sudoripares sont par contre normaux .
Ces hémorragies seraient la conséquence d'une augmentation de la perméabilité capillaire au niveau de la peau attaquée par l'enzyme protéolytique .
D' autre part la couche cornée présente une zone stratifiée .
La couche granuleuse est mal limitée ; les cellules sont séparées par un liquide intercellulaire abondant et contenant quelques granulations kératohyalines .

La présence parfois dans cette dermatose d'éléments papuleux pourrait évoquer une réaction à une libération locale d'histamine , mais le traitement par les antihistaniniques n'empêche pas l'apparition de cette dermatose , et ne modifie en rien son évolution .

Une dermatose similaire a été relatée en France par Tara et collaborateurs (1953) chez des travailleurs manipulant des pancréas . Deux cas sont signalés :

1 - M... X ... agé de 50 ans est employé depuis 15 jours en qualité de manoeuvre dans un laboratoire de biologie . Il fait le pulpage des glandes pour diverses fabrications pharmaceutiques . Le jour de l'accident il manipule du pancréas frais à mains nues . Au bout de 5 mn apparaît une sensation de picotement ; l'employé met alors des gants de caoutchouc , la sensation douloureuse devient de plus en plus pénible , et au bout d'une ½ heure il enlève ses gants :

- la face palmaire des mains et des doigts est littéralement érodée et saignante .
- il existe de petites ulcérations au pourtour des paumes et aux extrémités digitales .

L'arrêt de travail entraîne une guérison rapide ; au sixième jour l'épiderme de la face palmaire des mains paraît lisse et brillant. L'ITT est de 15 jours .

Dans ce cas l'action des enzymes pancréatiques a été favorisée par la sudation sous le gant de caoutchouc , des mains qui avaient déja été en contact avec l'enzyme .

2 - M... X... agée de 51 ans est employée au lavage de vaisselle d'un laboratoire de biologie . Elle se sert d'eau chaude , d'une brosse , de corps mouillants d'usage domestique courant .
Elle remarque que la peau de ses mains est abimée lorsqu'elle mani-

pule du pancréas .
Il existe des érosions saignantes des mains et des doigts d'évolution bénigne en quelques jours .

D' autres cas plus récents ont été signalés dans la région Parisienne : - certains font état d'une dermatose orthoergique identique à celle déja décrite
- d'autres par contre font état d'une dermatose allergique .
Ces cas sont les suivants:

1 - M... X... agé de 35 ans est employé en qualité de manoeuvre dans un laboratoire de produits pharmaceutiques , où l'on manipule des pancréas .
Au cours du nettoyage du laboratoire ses mains entrent en contact avec du sang de pancréas . A la suite de ce contact ses mains présentent des brûlures qui guérissent en quelques jours sans séquelles .

2 - H... X... agé de 37 ans est employé en qualité de manoeuvre dans un laboratoire de produits pharmaceutiques .
Après avoir manipulé des pancréas , malgré le port de gants , il présente une irritation palmaire des deux mains .
Cette irritation a guéri sans séquelles en 6 jours .
Ceci montre que les gants doivent être en bon état , les gants usés ne protègent pas .

3 - G... X... agé de 25 ans est employé en qualité de manoeuvre dans un laboratoire d'expérimentation de produits pharmaceutiques .
Après avoir manipulé des enzymes protéolytiques il présente des brûlures à la face palmaire des doigts des deux mains .
Ces brûlures ont été suivies d'une desquamation et d'un érythème .
Elles ont guéri en quelques jours sans séquelles .
On a noté par la suite une hyperhydrose des deux mains .

4 - V... X... agé de 24 ans est employé à la fabrication de produits pharmaceutiques .
Après avoir transporté à pleine main un sédiment de protéase humide il présente une sensation de brûlure au niveau du médius gauche.
L'ouvrier portait des gants de toile recouverts de gants de caoutchouc mais ils étaient percés à ce niveau .
L'examen a montré un érythème et des phlyctènes de la pulpe du médius gauche .
La guérison a été obtenue en 8 jours sans séquelles .
Ultérieurement l'ouvrier présentait une hyperhydrose palmaire , et un discret érythème du quart externe de la paupière inférieure gauche . Il travaille toujours au même poste et n'a pas eu d'autre accident .

5 - A... X... agé de 30 ans est employé dans un laboratoire de produits pharmaceutiques .
Dans ce laboratoire on emploie des protéases sous forme pulvérulente .
L'ouvrier a présenté une dermite eczématiforme du visage .
La guérison a été obtenue après un arrêt de travail de 15 jours .

6 - A... X... agé de 45 ans est employé dans un laboratoire de produits pharmaceutiques .
Il travaille au broyage de produits secs dérivés de bacillus subtilis où entrent des protéases .
Au bout de 6 heures de travail apparaît une sensation de picotements puis une rougeur et des démangeaisons au niveau du cou , du visage et des bras .
L'examen 7 semaines après montrait:

- des placards d'eczéma en voie de dessication sur chaque avant bras ,
- sur le corps et aux membres inférieurs , de nombreux petits placards nummulaires érythématosquameux d'eczéma sec .
- un érythème diffus du front sans altérations cutanées appréciables ,
- il n'y avait pas de lésions aux mains .

Des séquelles ont persisté :

- peau du cou sèche légèrement lichènifiée .
- persistance sur la face antérieure et la face externe de la jambe gauche , de lésions nummulaires , d'épiderme aminci , atrophique , de teinte violine .
- rares éléments d'eczéma subaigü sur l'index droit .

L'arrêt de travail a été de 2 mois .

En raison des séquelles l'ouvrier a obtenu une pension de 8% pour la durée d'un an .

Par la suite des récidives ont entrainé un changement de poste .

On peut donc individualiser 2 types d'accidents cutanés :

1/ une dermatose orthoergique, due aux phénomènes de digestion enzymatique des protéines de la peau .

2/ une dermatose allergique de type eczématiforme .

2)) LES ACCIDENTS RESPIRATOIRES

Les autres manifestations pathologiques provoquées par les enzymes protéolytiques sont de nature allergique .

Elles sont de constatation beaucoup plus récente , et ne sont apparues que les 6 ou 7 dernières années , lors de l'extension de l'utilisation des enzymes dans l'industrie .

Ces manifestations allergiques sont essentiellement pulmonaires et particulièrement graves car pouvant antraîner une insuffisance respiratoire chronique .

Elles posent le problème d'une prévention très rigoureuse .

Nous étudierons d'abord les expérimentations effectuées chez l'animal , puis les constatations faites chez l'homme .

A - Les expérimentations chez l'animal

Quelques expérimentations chez l'animal avaient déjà montré le dan-

ger des enzymes protéolytiques .

a) Injection de papaïne chez des rats silicotiques :

Les premières expériences furent faites chez des animaux présentant déjà une silicose pulmonaire provoquée par des poussières de quartz .

Technique :

Les rats subissent des injections intra-trachéales de papaïne (2mg) 2 fois par semaine .

Constatations :

- On note très rapidement une perte de poids importante , obligeant à ralentir les injections de papaïne .
- Tous les rats ayant subit des injections de papaïne , ont présenté un emphysème pulmonaire de type centro lobulaire .
- L'emphysème pulmonaire est déjà présent 1 semaine ½ après la première injection , c'est à dire après une dose de papaïne de 6 mg .
- Il n'y a pas de manifestations inflammatoires associées .
- La sévérité de cet emphysème semble fonction de l'âge des lésions et des doses de papaïne reçues .

b) Injection de papaïne chez des rats normaux :

Ces expériences un peu plus récentes présentent un intérêt supérieur car elles ont été faites chez des animaux normaux .

Technique :

Les rats subissent des injections intra-trachéales de papaïne comme précédemment .

Constatations :

Apparition très rapide :

- d'un emphysème pulmonaire
- d'un amaigrissement important

L'emphysème pulmonaire est retrouvé 6 heures seulement après une

seule injection intra-trachéale de papaïne .

Etude histologique :

Les poumons sont le siège d'une destruction des alvéoles et des bronchioles dans la partie proximale du lobule pulmonaire; cette destruction survient très rapidement .

Par contre la destruction alvéolaire de la partie distale ou périphérique du lobule pulmonaire semble généralement survenir plus tard .

c) Aérosol de papaïne chez le hamster :

Ces expériences sont pour nous les plus intéressantes car elles se rapprochent le plus des conditions observées chez le travailleur .

Technique :

Le hamster normal est soumis à un aérosol de papaïne pendant 4 heures .

Constatations :

- 18 heures après cette exposition on note chez tous les animaux exposés des signes de détresse respiratoire :
  - dyspnée
  - râles pulmonaires
  - sifflements

  et une perte de poids de 10 à 12 %
- L'étude histologique à ce stade montre :

  un aspect oedémateux des poumons et ,

  des pétéchies sur toute la surface pleurale .
- Evolution :

Les animaux récupèrent spontanément cette insuffisance respiratoire aigue en une semaine environ .

L'étude histologique lors de l'évolution montre :

Plusieures semaines après cette exposition tous les poumons des animaux exposés présentent de grosses lésions emphysémateuses bilatérales , avec bulles sur toute la surface des pou-

mons .

L'étude microscopique montre :

Un emphysème extensif dans tous les lobes , de type central et périphérique , caractérisé par la perte des septa alvéolaires. Les fibres élastiques sont déchirées et se trouvent en nombre réduit dans les zones situées à la périphérie des foyers d'emphysème .

On note aussi une dilatation des conduits bronchiques et occasionnellement des foyers d'atélectasie partielle .

d) Injection intradermique et intraveineuse d'enzyme protéolytique

Des expériences d'injection d'enzyme protéolytique ont été faites chez l'animal (cobaye , lapin , porc) et ont montré les résultata suivants :

- l'injection intradermique :

  elle détermine une réaction tissulaire similaire à celle produite par le choc allergique .

- l'injection intraveineuse :

  elle provoque un choc mortel reproduisant en tout point le choc anaphylactique .

L'étude histologique montre :

dans les deux cas les altérations sont les mêmes que celles rencontrées dans les réactions allergiques .

L'administration de neuroplégiques , d'antihistaminiques , la dénervation à la novocaïne peuvent comme dans le choc anaphylactique protéger l'animal contre les effets de l'enzyme protéolytique .
Il s'agit donc bien de phénomènes allergiques .

A la suite de ces expériences on a considéré que la libération d'un enzyme protéolytique était l'acte préliminaire à la base du déroulement des phénomènes allergiques .

Chez les animaux injectés on a remarqué que quelques uns présentaient

un emphysème pulmonaire .
Chez certains animaux on a trouvé des anticorps dans le sérum , mais de façon très inconstante .

Ces quelques expériences permettent d'entrevoir la danger des enzymes protéolytiques pour les ouvriers qui les manipulent et l'intérêt d'une prévention efficace .
Elles montrent aussi que l'emploi thérapeutique des enzymes protéolytiques sous forme injectable n'est pas dénué de risques .

Quant au mécanisme d'action des enzymes , il n'est pas encore élucidé .
Le déclenchement des manifestations allergiques est-il dû :

- à l'enzyme lui même
- ou aux produits de dégradation ?

Nous touchons là les frontières actuelles de la biochimie cellulaire .
Il serait en effet très intéressant de connaître à fond ce mécanisme d'action , car en s'en rendant maître on pourrait non seulement prévenir et guérir ces maladies professionnelles allergiques ,mais aussi de nombreuses autres maladies .

B - Constatations chez l'homme

Les manifestations pulmonaires allergiques survenant chez des ouvriers manipulant des protéases n'ont été individualisées que depuis quelques années .
Les accidents sont survenu essentiellement dans les industries manipulant des détergents contenant des enzymes protéolytiques .
Quelques rares accidents étaient déjà survenus dans les industries pharmaceutiques .

Les différentes manifestations observées sont les suivantes :

- asthme
- rhinite et conjonctivite .

LES MANIFESTATIONS ASTHMATIQUES

Ce sont les plus graves .

a) Les différents symptômes pulmonaires observés sont les suivants:

1- la dyspnée :

C'est le symptôme le plus fréquent et le plus significatif .
Elle peut être isolée ou associée à une respiration sifflante ou à d'autres manifestations de gêne respiratoire .
Son début :

Il est brutal , l'intensité est rapidement croissante pour aboutir le plus souvent à un état de dyspnée aiguë impressionnante donnant au malade une impression de mort imminente .

Sa durée :

La dyspnée dure en moyenne quelques heures .
Mais elle peut persister sur un mode aigu quelques jours voire même quelques mois .
A l'extrême elle réalise un tableau de dyspnée de décubitus rendant tout mouvement impossible .

2- La douleur thoracique :

Elle est fréquente ,
elle réalise une sensation de striction thoracique .

3- La toux :

Elle est peu fréquente .
Quand elle est présente elle est opiniâtre , et stérile , favorisée par une atmosphère froide ou irritante .

4- L'expectoration :

Elle est rare .

Lorsqu'elle existe elle est peu abondante et muqueuse .

b) Les signes généraux :

Ils sont peu évocateurs .

- asthénie ,
- état de malaise général , sont fréquents .

c) L'examen physique pulmonaire :

- Il peut être normal
- ou montrer la présence de quelques râles crépitants , ou de fins sifflements expiratoires disséminés dans les champs pulmonaires .

d) L'évolution :

- le début

Ces troubles peuvent apparaître très rapidement , même après quelques minutes d'exposition , au cours du travail .

Ils apparaissent d'autant plus rapidement que le poste est plus exposé .

Lorsque des troubles apparaissent au cours du travail ils sont d'intensité croissante si l'ouvrier ne cesse pas son travail .

Beaucoup plus souvent ils apparaissent après la journée de travail lorsque l'ouvrier est rentré chez lui ; c'est à dire après une exposition d'au moins 8 heures à la poussière d'enzyme .

- secondairement

Ces symptômes régressent pendant les week-ends pour recommencer à la reprise du travail .

Ils deviennent de plus en plus graves au cours du temps , si l'exposition au risque est maintenue ils peuvent à la longue réaliser une insuffisance respiratoire chronique .

e) Les examens complémentaires :

Ils permettent d'individualiser cette maladie et de retrouver son étiologie allergique .

- La radiographie pulmonaire :

Elle montre des signes polymorphes :

. aires de réticulation de dimensions croissantes
. ombres nodulaires
. opacités décroissantes (comparables à une pneumonie)
. images bulleuses
. enfin elle peut être normale .

Les signes radiologiques ne sont pas fonction de la gravité clinique de la maladie . Ils peuvent même apparaître après la guérison clinique .

- L'examen hématologique :

Il est en général normal et ne montre pas d'éosinophilie sanguine notable .

- L'examen de l'expectoration :

Il peut montrer dans quelques cas une éosinophilie .

- Les épreuves fonctionnelles respiratoires :

Elles ont toujours été pratiquées en dehors des épisodes respiratoires aigus , elles montrent :

. une diminution du VEMS
. une diminution de la capacité vitale
. un rapport VEMS/CV abaissé
. une ventilation maxima / minute très diminuée .

On est donc en présence d'un syndrome d'obstruction respiratoire , qui entraîne une insuffisance pulmonaire restrictive .

Les épreuves dynamiques : aérosol à base d'enzyme protéolytique majorent ces signes ou les font apparaître lorsqu'ils sont absents .

- Les tests cutanés :

Les tests cutanés par scarification ou intradermoréaction avec l'en-

zyme protéolytique incriminé sont en général positifs .
Ils restent positifs après chauffage de l'enzyme à 100° pendant 5mn.

Ils peuvent être positifs chez des individus ne présentant pas de manifestations cliniques de la maladie . L'exploration pulmonaire a montré dans ces cas la présence d'alvéolite ou d'un syndrome asthmatique .

De nombreuses recherches ont été faites pour retrouver des précipitines dans le sérum de ces malades , mais aucun résultat n'a été concluant .

Nous voyons donc que la poussière d'enzyme peut entraîner la formation d'une pneumopathie sévère pouvant mettre en jeu le pronostic vital de ces malades si l'exposition au risque est maintenue .
Cette pathologie justifie des mesures de prévention rigoureuses dans toutes les industries qui manipulent des protéases .

LES RHINITES ET LES CONJONCTIVITES

Elles sont nettement moins graves que les manifestations asthmatiques .

Des rhinites avec épistaxis peuvent se rencontrer .

3) TRAITEMENT DE CES ACCIDENTS

a - Les manifestations orthoergiques :

Le traitement de la dermatose orthoergique ne pose pas de problèmes particuliers .
On peut utiliser des crèmes protectrices et régénératrices de l'épiderme.

De toute façon elle guérit toujours même spontanément en quelques jours et sans séquelles .

2 - Les manifestations allergiques :

La dermatose :
Le traitement est celui d'un eczéma .
Mais il faut savoir que l'on peut soigner le sujet tout en maintenant l'exposition au risque , on peut espérer ainsi une désensibilisation .

Les accidents respiratoires :
Les crises d'asthme requièrent le traitement habituel d'un asthme.
Mais dans ce cas il est contre-indiqué d'instituer un traitement antiinflammatoire ou corticoïde , en maintenant l'exposition au risque .
Car alors la maladie continuerait à évoluer à bas bruit , faisant du malade progressivement un insuffisant respiratoire puis cardiaque .
Les crises d'asthme si elles se répètent imposent un changement de métier .
Ces accidents sont donc d'un pronostic social particulièrement grave .

III - UTILISATION INDUSTRIELLE DES ENZYMES PROTEOLYTIQUES

Les industries qui emploient des enzymes protéolytiques sont de plus en plus nombreuses .

1) LA FABRICATION INDUSTRIELLE DES ENZYMES PROTEOLYTIQUES

a - La papaïne :

La papaïne provient du latex de papayer : celui-ci est séché , mis en solution , puis purifié par précipitation au sulfate d'ammoniaque .

b - La broméline :

La broméline provient des tiges de l'ananas , celles-ci sont broyées , du jus obtenu est extrait l'enzyme selon la méthode de Trauber .

c - Les enzymes pancréatiques :

Ils sont préparés à partir de pancréas d'animaux de boucherie . Les pancréas sont prélevés puis macérés , séchés et étalés sous vide , les minces flocons ainsi obtenus sont dégraissés à l'éther de pétrole et broyés .

d - Les enzymes bactériens , microbiens et fongiques :

Leur fabrication relève de la fermentation en général aérobie ; elle nécessite beaucoup d'oxygène .
Les différentes étapes sont les suivantes :

- stérilisation du matériel de fabrication
- préparation et stérilisation du milieu de culture
- ensemencement
- fermentation
- extraction et purification

cette dernière étape diffère lorsque l'enzyme est destiné à l'industrie ou aux laboratoires pharmaceutiques .

- pour les enzymes industriels :

On sépare du liquide enzymatique les corps microbiens et l'on ajoute un antiseptique dont le but est de préserver le liquide enzymatique des infections externes ; car l'enzyme qui est une protéine , constitue lui-même une source alimentaire pour les micro-organismes de l'air .
L'enzyme peut ensuite être concentré sous vide .
Il est alors prêt à la standardisation sous forme liquide , ou l'extraction par différentes techniques de précipitation .
La précipitation est suivie d'un séchage .

- pour les enzymes utilisés dans des laboratoires pharmaceutiques

ou des industries alimentaires :

Il faut employer des techniques beaucoup plus sévères de purification et de conditionnement avec filtrations stérilisantes et travail en ambiance stérile .

2) LES INDUSTRIES EMPLOYANT DES ENZYMES PROTEOLYTIQUES

a - L'industrie textile :

Elle se sert non seulement d'enzymes protéolytiques mais aussi d'enzymes amylolytiques .
Les enzymes protéolytiques interviennent dans de nombreuses étapes de la préparation du textile :

- L'encollage :

Les enzymes protéolytiques sont utilisés pour obtenir des solutions de gélatine ou de caséine .
Cette opération se fait dans des linites strictes de température et de pH . La durée de la réaction permet de régler la viscosité de façon très précise , et de préparer des colles ou des apprêts exactement adaptés à l'utilisation désirée .
En général le bain est préparé à froid avec l'enzyme , il est ensuite versé de l'eau qui l'amène à la température voulue .
La liquéfaction commence instantanément et doit être arrêtée après un temps déterminé . Ceci est obtenu par inhibition de l'action enzymatique , soit par un abaissement du pH , soit en élevant rapidement la température jusqu'à l'ébullition.

- Le désencollage :

C'est l'application textile des enzymes la plus importante .
Le désencollage consiste en une hydrolyse de l'agent d'encollage et son efficacité est essentielle pour obtenir de bons résultats dans les opérations de blanchiment, de teinture , d'impression et d'apprêt .
Le désencollage enzymatique est donc une préparation à ces opérations .

Il nécessite un mouillage préliminaire puissant (ceci est important car les agents mouillants pourraient favoriser l'action des enzymes sur la peau) .

- Les traitements de la laine :

Les enzymes protéolytiques sont employés dans le traitement irrétrécissable et infeutrable de la laine .
On rend les fibres infeutrables en provoquant une attaque enzymatique contrôlée en milieu aqueux , qui n'affecte que les écailles de la fibre de laine .
Pour conférer à la laine des propriétés d'irrétrécissabilité on emploie un traitement combiné avec de la papaïne , du chlore et de l'eau oxygénée .

- Le décreusage de la soie :

La sérine est éliminée par un enzyme protéolytique : la papaïne .

- Le rouissage des fibres libériennes :

Il consiste en une élimination par fermentation des matières résinogommeuses reliant les fibres dans la plante .
C'est la flore microbienne in situ qui sécrète les enzymes capables de solubiliser les pectines et les lignines .
Il ne semble pas que l'on ait tenté de remplacer cette méthode ancienne par un traitement aux enzymes isolés chimiquement.

b - L'industrie des peaux :

- Le délainage :

Il permet de récupérer les peaux et les poils ; ceux-ci seront utilisés dans l'industrie textile .
Cette opération a pour but de dissoudre les matières qui constituent le follicule pileux de la laine afin de faciliter le détachement du poil .
La peau est d'abord préparée par trempage , en évitant le développement de la flore microbienne , puis le traitement par

les enzymes protéolytiques est effectué soit en bain aéré , soit par saupoudrage d'enzymes du côté chair et étuvage .
Le délainage est ensuite réalisé soit à la main , soit à l'aide de machines .
Cette méthode présente de nombreux avantages par rapport aux anciens procédés chimiques :

- le poil et la laine sont récupérés sur toute leur longueur
- ils sont parfaitement ménagés ,
- la peau est propre et très brillante ,
- le problème des eaux résiduaires est grandement simplifié.

Par rapport au délainage à l'échauffe :

- la laine est propre et ménagée ,
- le cuirot est respecté au maximum .

- Le reverdissage :

Le principe en est l'hydrolyse des albumines et des globulines qui collent les fibres entre elles .
Les jus de trempage reverdissent mieux et plus vite que l'eau pure .
L'emploi d'enzymes dans ces jus permet donc d'accélérer l'opération .

- Le confitage :

Le confitage combiné au déchaulage permet de compléter la préparation au tannage par des modifications biochimiques du derme .
Les anciens confits , ou confits naturels étaient constitués d'excréménts de chien ou de pigeon fermentés , ils agissaient par les enzymes contenus et sécrétés par les bactéries présentes dans le milieu .
Les premiers confits artificiels sont apparus en 1908 (Rohm).
On utilisait un confit pancréatique .
C'est à partir de 1928 que l'on a utilisé des confits à base d'enzymes bactériens .
L'utilisation d'enzymes lors de cette étape a considérablement assaini l'industrie des cuirs .

Dans l'ensemble les enzymes protéolytiques ont permis un travail beaucoup plus rapide et une meilleure rentabilité .

c - L'industrie des détergents :

Les protéases ne sont apparues dans l'industrie des détergents que depuis ces dernières années , elles y ont rendu de grands services . Elles entrent actuellement dans la constitution de la majorité des lessives .

Une lessive est constituée actuellement de :

- polyphosphates de soude
- carbonate de soude
- agents tensioactifs
- perborates
- enzymes protéolytiques .

L'adjonction d'enzymes protéolytiques dans les lessives ne présente pas de risques nouveaux pour les ménagères qui les utilisent car :

- cette utilisation est peu fréquente
- les protéases sont à faible concentration
- enfin elles sont inactivées à 60° .

d - L'industrie de la bière :

Les principaux enzymes intervenant dans la fabrication sont :

- les amylases
- les enzymes protéolytiques .

La fabrication de la bière comprend trois étapes :

- le brassage
- la fermentation
- la garde .

- au cours du brassage :

Les protéines subissent une certaine hydrolyse . Elles sont responsables en partie des caractères de la bière .

Elles ne doivent pas se trouver en excès car la bière n'aurait plus alors aucune stabilité au froid .

- au cours de la garde :

C'est à dire la période de 3 semaines à 2 mois après la fermentation pendant laquelle la bière mûrit en tanks sous pression de gaz carbonique , on ajoute des enzymes protéolytiques . Ces enzymes hydrolysent les protéines de poids moléculaire trop élevé , qui sont sensibles aux variations de température occasionnées par la pasteurisation , la manutention , le transport , et le refroidissement avant dégustation .
Une bière insuffisamment protégée se trouble par coagulation des protéines .
L'emploi des enzymes protéolytiques est devenu indispensable avec la généralisation de la vente en petites bouteilles , il permet l'envoi à des distances éloignées de bières gardant toutes leurs qualités .

e - L'industrie pharmaceutique :

Les enzymes protéolytiques sont aussi largement employés .
La trypsine pour le nettoyage des plaies qu'elle assure en dissolvant les tissus morts .
L'α chymotrypsine pour ses propriétés antiinflammatoires .

f - Les industries alimentaires :

Les enzymes protéolytiques ont aussi une large application :
- dans les fromageries :

La présure contenue dans la caillette de veau est d'utilisation très ancienne .
Elle reste encore seule utilisée .
Pourtant les enzymes protéolytiques microbiens possèdent comme la présure animale la propriété de faire cailler le lait , mais ils feraient de moins bons fromages .

dans les industries des jus de fruit :

Nous avons déjà vu les inconvénients provoqués par la broméli-

ne dans les conserveries d'ananas .

L'industrie des jus de fruit utilise des enzymes protéolytiques car ils facilitent le pressage , améliorent la filtration et clarifient le jus .

- dans les boulangeries :

Amylases et protéases fongiques sont actuellement très utilisées :

. pour leur action amylolytique sur l'amidon

. pour leur action protéolytique sur le gluten .

Elles stimulent la fermentation et modifient les propriétés plastiques du pain .

Les pains ont alors une mie beaucoup plus régulière et une croûte plus dorée .

g - Les industries des produits de beauté :

Certaines préparations cosmétiques contiennent des enzymes protéolytiques :

- les dépilatoires
- certains dentifrices
- les liquides pour permanentes
- certaines crèmes et lotions faciales .

h - Récupération de l'argent des films :

Les enzymes protéolytiques servent à la récupération de l'argent des films de cinéma ou des plaques de radio . Elles hydrolysent la gélatine , constituant essentiel de ces films .

Nous voyons donc que les applications industrielles des enzymes protéolytiques sont multiples ; étant donné leur danger il se pose maintenant un problème de protection pour les travailleurs qui les manipulent .

IV - LES MOYENS DE PROTECTION

Certaines propriétés sont fondamentales à connaître :

- les seuls enzymes créant une nuisance sont ceux qui ont une spécificité pour la peau ou les muqueuses .
- Il faut très peu d'enzymes pour créer une nuisance .

Certains facteurs favorisent l'action pathologique des enzymes :

- Les facteurs personnels :
  . terrain allergique

- Les facteurs propres à l'enzyme :
  . La dissolution :
  Les enzymes dilués sous forme liquide sont moins nocifs , les problèmes de protection sont différents si l'enzyme est sous forme liquide , ou sous forme pulvérulente .
  . La concentration :
  Les enzymes en poudre sont d'autant plus nocifs que leur concentration est plus forte .
  . La granulométrie :
  Pour une même granulométrie plus l'enzyme est actif plus il est dangereux .
  Pour une même activité plus l'enzyme est pulvérulent plus il est nocif .
  . La température et le pH :
  Les enzymes ne sont actifs que dans des limites strictes de température et de pH .

Nous voyons que de nombreux facteurs interviennent dans la nuisance créée par les enzymes .

Le problème de la protection des travailleurs se pose différemment selon que l'enzyme est sous forme solide ou liquide .

1) UTILISATION D'ENZYMES EN PHASE LIQUIDE

a - La protection collective :

Lorsque l'enzyme est utilisé sous forme liquide c'est surtout la phase de dissolution qui présente un risque .
L'enzyme est en effet initialement en poudre , et son déversement dans un liquide est dangereux par les poussières que peut disperser cette opération .
Nous rejoignons ici les moyens utilisée pour les enzymes en poudre .

b - La protection individuelle :

Ce sont surtout les mains qui sont en contact avec le liquide enzymatique .
La protection des mains s'effectue par le port de gants .
Il faut que ce port soit obligatoire .
- On peut utiliser un gant classique en caoutchouc remontant haut sur l'avant bras , mais qui présente l'inconvénient de provoquer une transpiration des mains et de laisser pénétrer quelques poussières . D'autre part son usure supprime toute efficacité .
- Un autre système consiste à porter un gant de coton sous le gant de caoutchouc ; il a l'avantage d'absorber la sueur , mais il a l'inconvénient de s'empoussiérer aussi doit il être changé souvent .

On peut renforcer cette protection par l'utilisation de savons et de crèmes protectrices .

2) UTILISATION D'ENZYMES EN PHASE SECHE

Deux cas peuvent se présenter :
- L'enzyme est utilisé pour former un complexe de base se présentant sous forme de granules :
Les problèmes de protection sont déjà importants car ils se posent

sur l'ensemble des opérations de formation de ce complexe et essentiellement :

- le déversement
- le pesage
- le mélange
- le tamisage

- L'enzyme est déversé dans d'autres produits pulvérulents pour en faire un mélange :
Dans ce cas c'est toute l'installation de fabrication qui doit être protégée .

a - La protection collective :

Elle consiste en deux points importants :
- tout d'abord empêcher la formation de poussières dans l'atelier
- puis minimiser les effets des poussières lorsque celles-ci ont été formées .

- Empêcher la formation de poussières dans l'atelier :

Lorsqu'il s'agit d'opérations simples sur un appareil unique faisant intervenir une faible quantité d'enzyme , une simple aspiration peut suffire .

Lorsqu'il s'agit d'opérations complexes faisant intervenir de nombreux appareils et une grande quantité d'enzyme , il est alors indispensable d'utiliser un système clos à fonctionnement automatique, les transferts entre les différents appareils se faisant par des conduits étanches , le tout étant sous dépression .
Malgré toutes ces précautions 3 postes peuvent encore émettre des poussières ce sont :

- l'ensachage
- le déversement
- le tamisage

La protection de ces postes se fait de la façon suivante :

- Pour l'ensachage :

L'aspiration circulaire de l'orifice assure une bonne protection

- Pour le déversement :

On utilise un système boîte à gants .

- Pour le tanisage :

On utilise des gaines de caoutchouc qui évitent l'émission de poussières .

- Atténuer l'effet des poussières formées :

Lorsque malgré toutes ces précautions des poussières se sont formées il faut essayer d'atténuer leur effet :

. en isolant les postes à poussières
. en créant une dépression dans ces ateliers

- Les contrôles d'atmosphère :

Dans tous les ateliers susceptibles d'être soumis à un empoussiérage il est indispensable d'effectuer des contrôles d'atmosphère ; l'appareillage utilisé est un appareil de précipitation électrostatique .
Les hygiénistes Américains ont proposé une valeur maximum tolérable pour les enzymes dérivés de bacillus subtilis cette valeur est de 0,0003 mg/m^3 estimé en enzyme pur cristallisé .
Cette valeur est encore à l'étude .
On remarque qu'elle est très basse ce qui démontre bien la toxicité du produit .

- Supprimer les interventions dans les appareils :

Les appareils doivent être strictement automatiques .
Des précautions doivent être prévues lors de révisions ou de réparations des appareils .

- Eviter les accidents de manutention :

Les conditionnements contenant des enzymes protéolytiques doivent être solides pour éviter toute rupture qui entraînerait une disper-

sion de l'enzyme .
En cas de rupture d'emballage il faut prévoir une enveloppe plastique et une récupération en vase clos .

b - La protection individuelle :

Elle consiste à protéger les voies aériennes supérieures .
Elle est fondamentale et doit être rigoureuse dans les postes particulièrement exposés .

- Les vêtements de travail :
Ils doivent être serrés aux poignets , cou et chevilles pour éviter la pénétration des poussières .
L'ouvrier doit porter des gants comme précédemment .
Les gants doivent être changés fréquemment .
Le gant de coton s'humidifie vite par la transpiration et l'on sait que la sueur favorise l'action des enzymes protéolytiques sur la peau .
On peut aussi utiliser des cagoules pour la protection du visage .

- Les masques :
Le demi masque à menbrane de cellulose protégeant la bouche et le nez n'est efficace qu'un certain temps .
Il n'est pas parfaitement étanche : il laisse passer les poussières de l'ordre de 0,5 microns .
Il fixe la poussière à son pourtour .

- Les cagoules :
Si le travail ne peut se faire rigoureusement en vase clos il est indispensable d'équiper les ouvriers de cagoules avec arrivée d'air frais en surpression .

Des douches et des vestiaires séparés sont aussi indispensables .

En cas de contamination cutanée :
Il faut prévoir le lavage de la peau avec des solutions non agressi-

ves , à un pH arrêtant toute activité enzymatique .

CHAPITRE IV

LA LEGISLATION

I - LES NORMES INDUSTRIELLES :

Nous avons vu au cours de cette étude que les enzymes protéolytiques sont des substances dangereuses à manipuler , et essentiellement ceux qui sont sous forme pulvérulente .
Le législateur peut donc faire appliquer à ces substances des règles sur :
- le conditionnement
- l'étiquetage .

a) Le conditionnement :

Enzymes sous forme liquide ou pâteuse :
Les problèmes de conditionnement ne se posent pas en général ,car les enzymes sont manipulés sous forme pulvérulente et ne sont dissous qu'au moment de l'emploi .

Enzymes sous forme pulvérulente :
C'est ici que se posent les problèmes de conditionnement , car c'est la façon habituelle de manipuler les enzymes .
Lorsque la proportion d'enzymes dans le produit est très faible , il n'y a pas de problèmes particuliers étant donné le peu de risque .
Par contre lorsque la proportion d'enzymes est importante le conditionnement doit être strictement étanche et résistant , de façon à éviter toute rupture entraînant le déversement du produit .

b) L'étiquetage :

Il serait souhaitable d'indiquer sur une étiquette la présence d'enzymes dans un produit .
D'autre part il serait intéressant de fixer expérimentalement un seuil de toxicité .

II - REPARATION DES MALADIES PROFESSIONNELLES CAUSEES PAR LES ENZYMES PROTEOLYTIQUES

Nous sommes ici en présence d'une maladie professionnelle , qui dans la législation actuelle ne bénéficie d'aucune réparation .

Nous pouvons proposer la réparation :

- de la dermatose
- de la maladie pulmonaire
- des manifestations de rhinite ou de conjonctivite .

- La dermatose :

Il peut s'agir d'une dermatose orthoergique :
caractérisée par des ulcérations sanguinolantes siègeant sur les mains , survenant très rapidement , et guérissant toujours sans séquelles après une disparition temporaire des empreintes digitales .
Il peut s'agir d'une dermatose allergique :
De type eczématiforme .

- La maladie pulmonaire :

Elle se caractérise par des manifestations asthmatiques :
épisodes de dyspnée aigue , toux , expectoration .
Des signes radiologiques ;
des tests cutanés positifs .

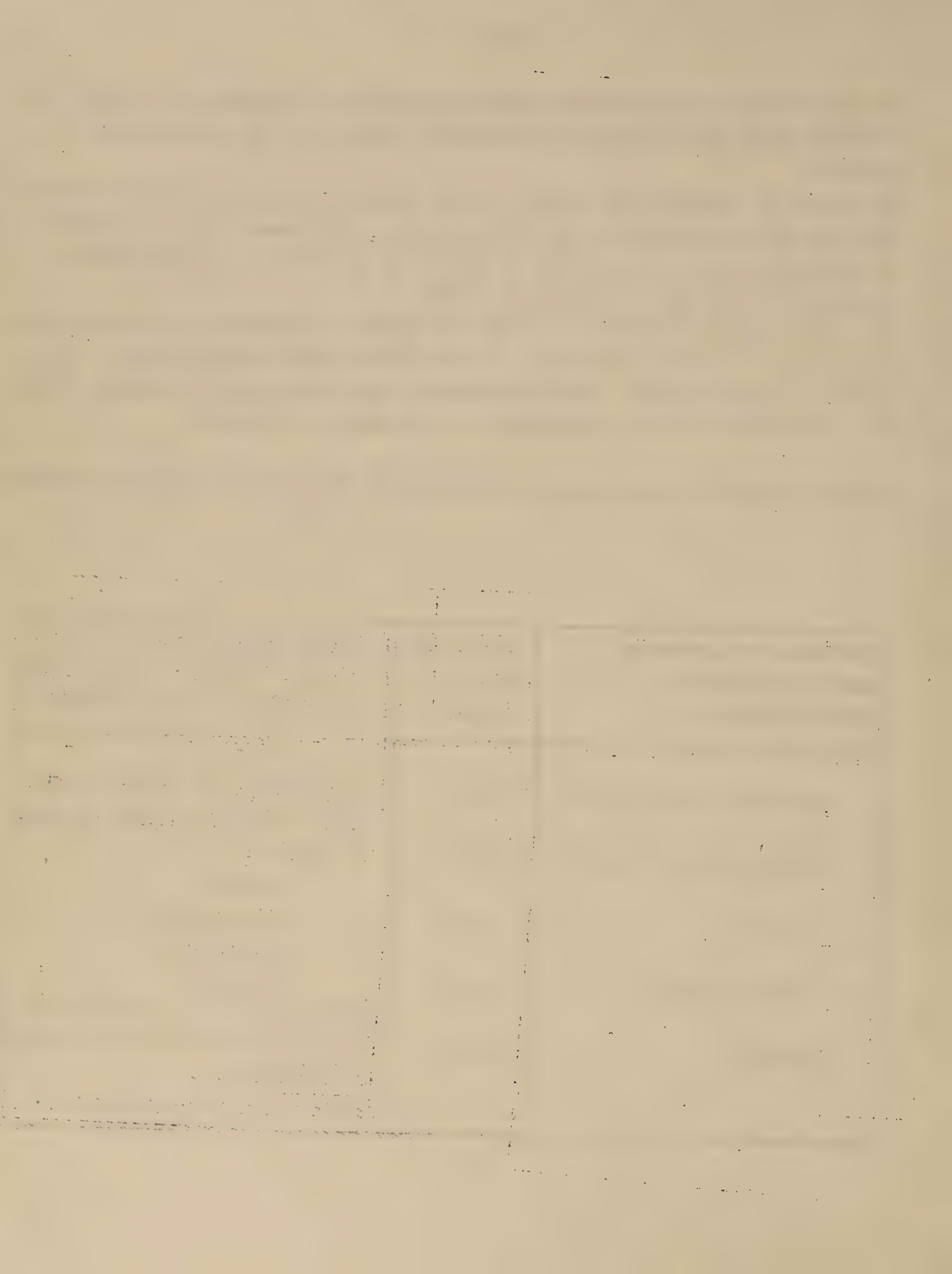
Les principaux travaux susceptibles de provoquer ces maladies sont les suivants :

- Préparation et emploi d'enzymes protéolytiques en phase liquide .
- Extraction de pancréas .
- Préparation et emploi d'enzymes protéolytiques en phase sèche : pesage
  déversement
  ensachage
  tamisage .

La réparation des maladies professionnelles allergiques est peu compatible avec un système de réparation fondé sur la présomption d'origine .
La prise en charge des soins et des indemnités journalières s'applique mal aux manifestations allergiques , celles-ci posent souvent la question d'un changement de poste ou de métier , qu'il serait souhaitable de prévoir pour un asthme .
Il serait donc justifié de proposer pour la réparation non seulement la prise en charge des soins et des indemnités journalières , mais aussi la possibilité d'un reclassement professionnel ou quand celui ci est impossible une indemnité de changement d'emploi .

Dans la législation actuelle on pourrait proposer le tableau suivant:

Maladies engendrées par les enzymes protéolytiques	Délai de prise en charge	Liste indicative des principaux travaux susceptibles de provoquer ces maladies
1 - Dermite eczématiforme .	7 jours	Préparation et emploi d'enzymes protéolytiques en phase sèche :
2 - Ulcérations cutanées	7 jours	pesage
3 - Asthme .	7 jours	déversement
		ensachage
4 - Conjonctivite .	7 jours	tamisage
5 - Rhinite .	7 jours	Préparation et emploi d'enzymes protéolytiques en phase liquide .
		Extraction de pancréas .



CONCLUSION

En conclusion :

L'emploi d'enzymes protéolytiques présente un intérêt fondamental dans l'industrie moderne , et cet emploi est probablement appelé à s'intensifier au cours des années à venir .

Les enzymes protéolytiques sont dangereux pour le travailleur ; ils peuvent provoquer deux types d'accidents :

- les accidents orthoergiques
- les accidents allergiques .

- Les accidents orthoergiques :

Il s'agit d'une dermatose due à l'emploi d'enzymes en phase liquide .
Ces accidents sont connus depuis longtemps , gênants mais peu graves pour le travailleur :

- car ils guérissent toujours sans séquelles ,
- car leur prévention est simple et facile .

Dans cette étude nous présentons quelques cas nouveaux de cette dermatose .

- Les accidents allergiques :

Ils sont dus à l'emploi d'enzymes en phase sèche .
Ils sont d'individualisation récente , apparus lors de l'utilisation d'enzymes protéolytiques dans les détergents .
Ils sont de deux types :

- la dermite eczématiforme
- les accidents pulmonaires allergiques .

La dermite eczématiforme :

Elle peut siéger sur tout le corps . Son traitement est celui d'un eczéma banal . Il ne faut pas soustraire le malade au risque en le soignant , on peut ainsi espérer une désensibilisation .
Nous présentons aussi quelques cas nouveaux de dermite eczématiforme survenus dans la région parisienne .

Les accidents pulmonaires :

Ils sont caractérisés par des phénomènes asthmatiques aigus .Ils sont extrêmement graves car en présence d'une exposition au risque maintenue , ils peuvent évoluer vers l'insuffisance respiratoire chronique puis la défaillance cardiaque . Cette évolution peut se faire à bas bruit en présence d'un traitement antiinflammatoire associé à la persistance du risque .
Leur pronostic social est très grave car ils imposent un changement de poste ou de métier .
Or ceci n'est pas prévu dans la législation actuelle de réparation des maladies professionnelles .
Il serait cependant souhaitable que les maladies professionnelles allergiques puissent bénéficier d'indemnités de changement de poste ou de métier .

Nous sommes ici en présence d'une nouvelle maladie professionnelle pour laquelle nous avons présenté un tableau de réparation en accord avec la législation actuelle .

Cette maladie par sa gravité pose des problèmes de prévention considérables ; les moyens de protection doivent être rigoureux :
Au niveau de la fabrique :
opérations en vase clos
isolement des postes à poussières
contrôle de l'empoussiérage de l'atmosphère pour lequel les hygiénistes Américains ont proposé comme valeur maximale admissible :
0,0003 mg / m^3 d'enzyme pur cristallisé .

Cette valeur très basse montre la toxicité de ce produit que l'on peut classer parmi les allergènes majeurs .

Lorsque malgré toutes les précautions précédentes il persiste un empoussiérage de l'atmosphère , il faut aller pour le travailleur jusqu'au port d'une cagoule avec adduction d'air frais en surpression .

BIBLIOGRAPHIE

1 - ARDRY R. : Principe du contrôle des préparations enzymatiques utilisées en thérapeutique .
Labo pharma janvier 1963 .

2 - AVRAEMAS S. : Isolement et caractérisation enzymatique et immunochimique de quelques enzymes du pancréas de porc .
Thèse Sc. Nat . Paris 1964 .

3 - BABIN R. : La papaïne , action enzymatique , son rôle dans la croissance et l'inhibition microbienne .
Thèse pharmacie Bordeaux 1953 .

4 - BERNIER : Dosage de la trypsine et de la pepsine au moyen de la gélatine des films photographiques .
Entretients de Bichat 1953 p389-392

5 - BLANCHER : Emploi des enzymes dans l'industrie de la peau de mouton .
Bulletin documents et informations n°4 avril 1963 .

6 - BOIDIN : Les enzymes , propriétés , fabrication ,utilisation .
Bulletin documents et informations n°4 avril 1963 .

7 - Bulletin de la société de chimie et biologie : Les unités enzymatiques . 1959 n°41 p 928 .

8 - CABANIEU : A propos de l'allergie aux enzymes protéolytiques courants .
Revue française d'allergie avril-juin 1969 n°2 p123 .

9 - Congrès de Genève : Les enzymes en thérapeutique . Oct 1961 .

10 - COOPER : Traitement local des brûlures par des enzymes .
American jour. of diseases of children . 1943 n°65 p909 .

11 - CRIEP - LEWI - BEAM : Allergie à la trypsine .
jour . of allergy 1964 - 35 - p 425 .

12 - DUMONT M. : Considération sur l'emploi des enzymes protéolytiques comme attendrisseur de viande .
Thèse Alfort 1964 .

13 - FLINDT : Affections pulmonaires causées par inhalation des dérivés de bacillus subtilis contenant des enzymes protéolytiques .
Lancet juin 1969 vol 1 n° 7607 p 1177-1181 .

14 - GLASSER : American jour. of surgery .
1940 n°50 p320 .

15 - GOLDRING : Production d'emphysème chez les hamster syriens par inhalation d'aérosols à la papaïne .
Arch . environ . health 1968 - 16 - n°1 p 59-60 .

16 -GRASSMANN - HEYDE : Dosage enzymatique .
jour. physiol. chem; 1929 - 83 - p425 .

17 - GROSS : Emphysème expérimental produit avec la papaïne chez les rats normaux et silicotiques .
Arch. environ. health juillet 1965 - 11 - p50 - 58 .

18 - GROSS : Emphysème expérimental provoqué par les enzymes .
jour. occ. med. dec. 1964 -6- n°12 p 481-484 .

19 - LINDERSTROM :
jour. physiol. chem. 1959 - 234 - p294 .

20 - MAC LAREN : Allergie à la chymotrypsine .
jour. of allergy 1957 - 28 - p 89 .

21 - NICOLAU - BADANIOU : Intervention d'un processus protéolytique dans le déclenchement de réactions allergiques .
Presse médicale 1961 p 1161-1164 .

22- PEPYS : Réactions allergiques du poumon aux enzymes de bacillus subtilis .
Lancet juin 1969 - 1 - n° 7607 p 1181-1184 .

23 - POLUNIN : La dermatose du jus d'ananas .
Brit. jour. of dermato. 1951 - 63 - n°12 p 441-455 .

24 - RIBET A. PASCAL JP. : Le pancréas exocrine .

25 - SCHWARTZ :
Industrial medicus 1944 - 13 - p 899

26 - SCHWARTZ TABERSHAW :
jour. of indus. hyg. and tox. 1954 - 27 - p 27 .

27 -SCHWERT : dosage enzymatique à la ninhydrine .
jour. biol. chem. 1948 - 174 - p411 .

28 - SCHWERT : Mesure de l'activité trypsique .
jour. biol. chem. 1952 - 199- p 789 .

29 - TARA : Les dermites du pancréas .
Arch. des maladies prof. 1953 - 13 - p 899 .

30 - WUTHRICH B. OTT F. : L'athme professionnel causé par les enzymes dans l'industrie des produits de lessive .

journal Suisse de médecine nov 1969 - 99 - n° 44
p 1584 - 1586 .

31 - ZWEIMAN : Sensibilisation provoquée a la trypsine par inhalation .
jour. of allergy janv 1967 - 39 - n° 1 p 11-16 .

Vu : le Président de thèse : H. Desoille

Vu : Le Doyen de la faculté de médecine : J. Baumann

Vu et permis d'imprimer : le Recteur de l'académie de Paris :
G. Mallet